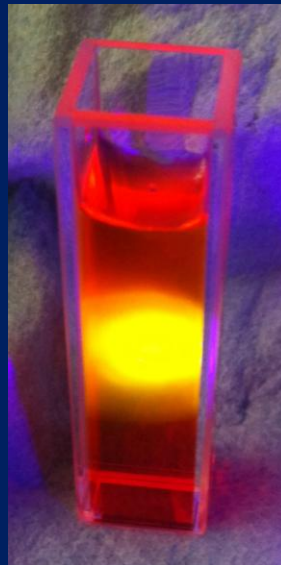


APPLICAZIONI BIOLOGICHE DELLA FLUORESCENZA

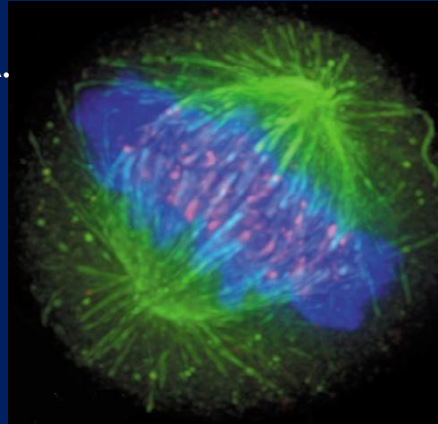
La citofluorimetria



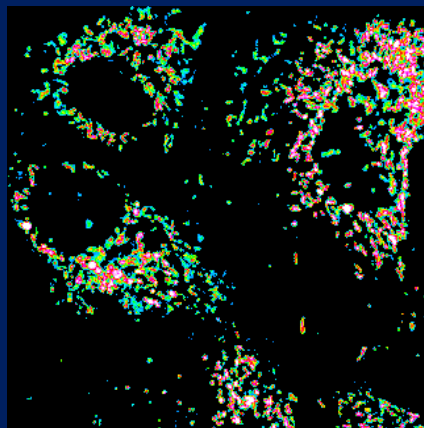
Microscopia a fluorescenza

Cosa posso vedere?

- Blu DAPI legato al DNA.
- Rosso : anticorpo fluorescente legato al centromero.
- Verde: anticorpo fluorescente legato alla tubulina.

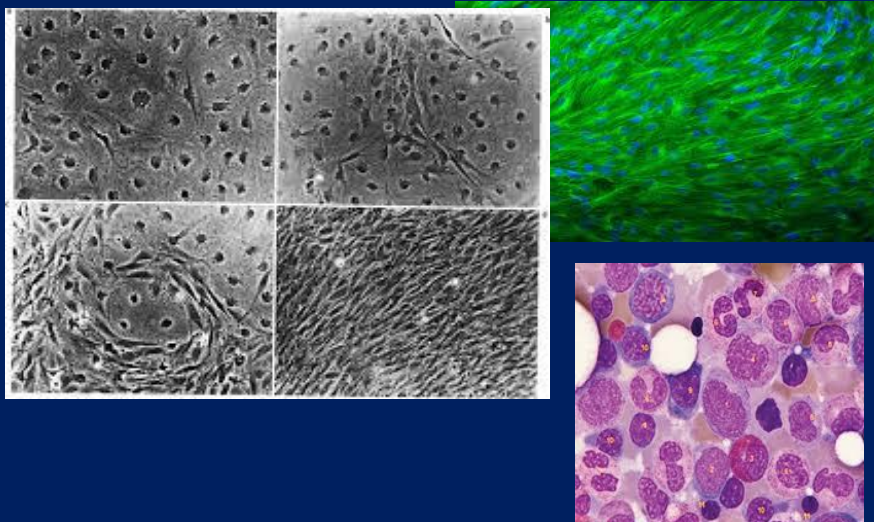


Rodamina 123

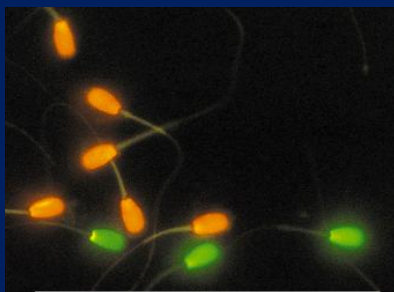


*Rhodamine 123 staining mitochondria (endothelial cells)
Imaged on a Bio-Rad MRC 1024 scope*

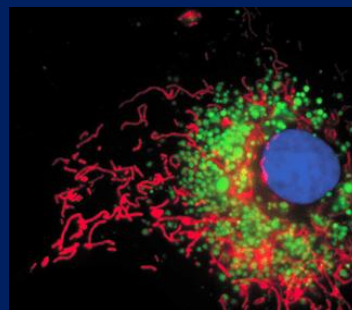
Ma cosa succede se voglio avere una
analisi statistica della popolazione?



Se ho un singolo parametro o al massimo
due posso anche contare al microscopo ma
se ne ho di piu'?

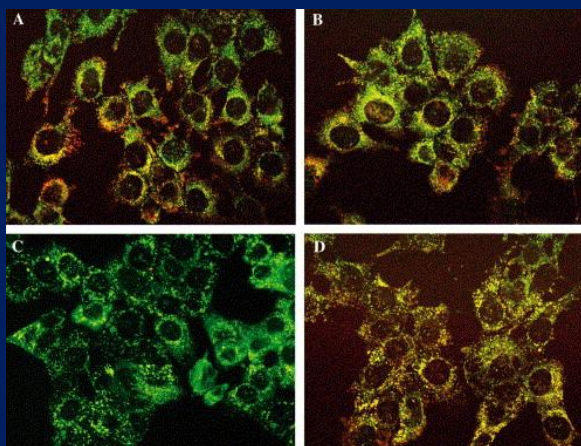


Vitalità di spermatozoi bovini
Membrane intatte: verde
Cellule morte: arancio (PI)



Mitocondri, lisosomi e nucleo

E se le variazioni dell'intensita' del segnale sono piccole?



CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

E' una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule **monodisperse** sospese in un mezzo fluido.

Consente di misurarne le caratteristiche fisiche e/o biochimiche all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente di eccitazione

Rende possibile la misurazione di **proprietà multiple** di singole cellule ad una velocità molto elevata (5000 cell/secondo), permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa.

Measurable parameters [\[edit\]](#)

This list is very long and constantly expanding.

- used for confirming diagnosis of chronic lymphocytic leukemia
- volume and [morphological](#) complexity of cells
- cell pigments such as [chlorophyll](#) or [phycoerythrin](#)
- total DNA content ([cell cycle analysis](#), [cell kinetics](#), [proliferation](#), [ploidy](#), [aneuploidy](#), [endoreduplication](#), etc.)
- total RNA content
- DNA copy number variation (by [Flow-FISH](#) or [BACs-on-Beads](#) technology)
- [chromosome analysis](#) and sorting (library construction, chromosome paint)
- protein expression and localization
- Protein modifications, phospho-proteins
- transgenic products *in vivo*, particularly the [Green fluorescent protein](#) or related Fluorescent Proteins
- cell surface [antigens](#) ([Cluster of differentiation](#) (CD) markers)
- [intracellular](#) antigens (various [cytokines](#), secondary mediators, etc.)
- [nuclear antigens](#)
- [enzymatic](#) activity
- pH, intracellular [ionized calcium](#), [magnesium](#), [membrane potential](#)
- [membrane fluidity](#)
- [apoptosis](#) (quantification, measurement of DNA degradation, mitochondrial membrane potential, permeability changes, [caspase](#) activity)
- [cell viability](#)
- monitoring electroporation of cells
- [oxidative burst](#)
- characterising [multidrug resistance](#) (MDR) in cancer cells
- [glutathione](#)
- various combinations (DNA/surface antigens, etc.)
- cell adherence (for instance pathogen-host cell adherence)

Fluorescence units

Use of flow cytometry to measure copy number sequence ([Flow-FISH](#))

Applications [\[edit\]](#)

The technology has applications in a number of fields, including [molecular biology](#), [pathology](#), [immunology](#), [plant biology](#) and [marine biology](#). It has broad application in [medicine](#) (especially in transplantation, hematology, tumor immunology and chemotherapy, prenatal diagnosis, genetics and [sperm sorting for sex preselection](#)). In marine biology, the autofluorescent properties of photosynthetic [plankton](#) can be exploited by flow cytometry in order to characterise abundance and community structure. In protein engineering, flow cytometry is used in conjunction with [yeast display](#) and [bacterial display](#) to identify cell surface-displayed protein variants with desired properties.

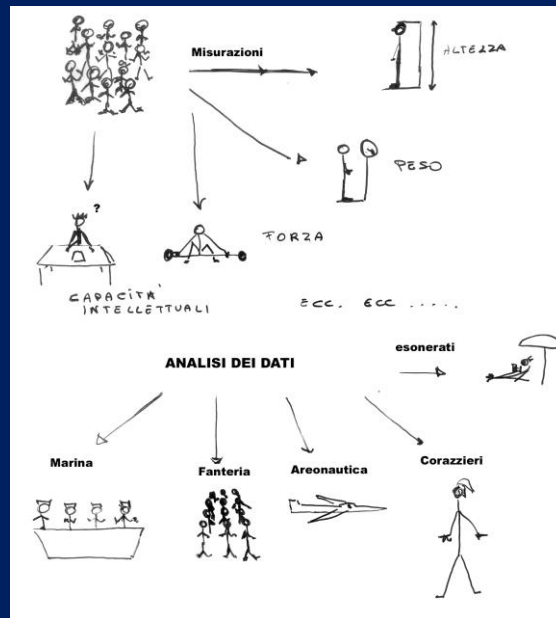
Ad esempio....

Come posso valutare gli effetti di un potenziale farmaco antitumorale?

Valuto in cellule tumorali e normali:

- Gli effetti antiproliferativi
- L'induzione di apoptosi e/o autofagia
- Lo stress ossidativo
- Il potenziale mitocondriale
- L'espressione di proteine coinvolte in cascate di trasduzione del segnale

PICCOLA PARENTESI STATISTICA



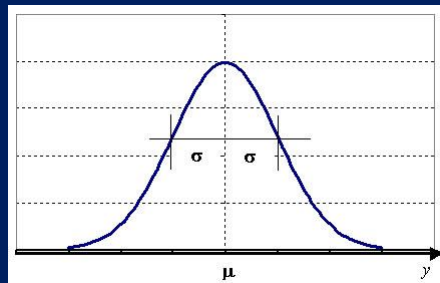
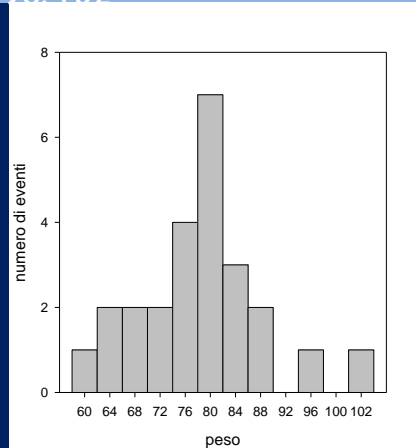
Come posso fare una analisi statistica di tutti i miei dati?

Cos'è un istogramma

Peso:

58, 62, 65, 67, 69, 70, 72, 75, 76, 76, 77, 78, 78, 78, 78, 80,
80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 96, 102

Canale 58-61 = 1
Canale 62-65 = 2
Canale 66-69 = 2
Canale 70-73 = 2
Canale 74-77 = 4
Canale 78-81 = 7
Canale 82-85 = 3
Canale 86-89 = 2
Canale 90-93 = 0
Canale 94-97 = 1
Canale 98-101 = 0
Canale 102-105 = 1

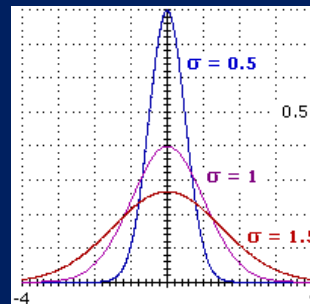


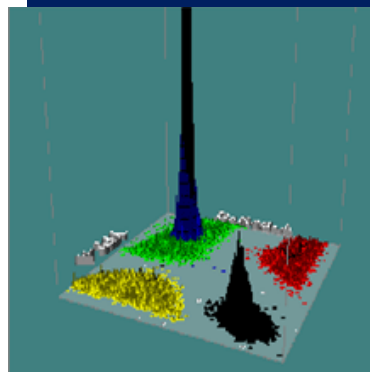
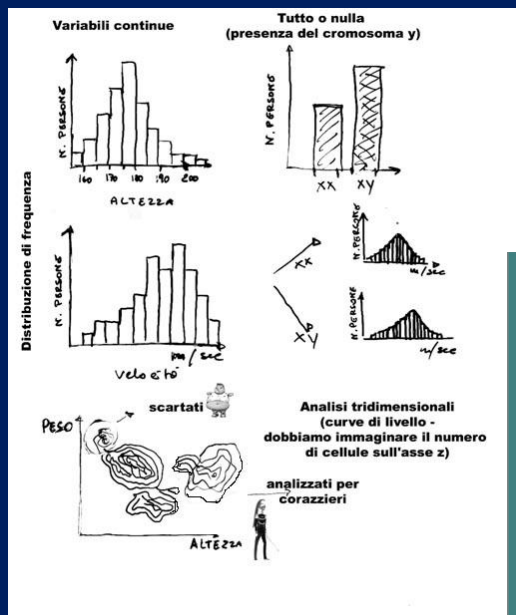
Da una distribuzione di questo genere posso ricavarmi una serie di informazioni:

MEDIA

VARIABILITA' :
deviazione standard

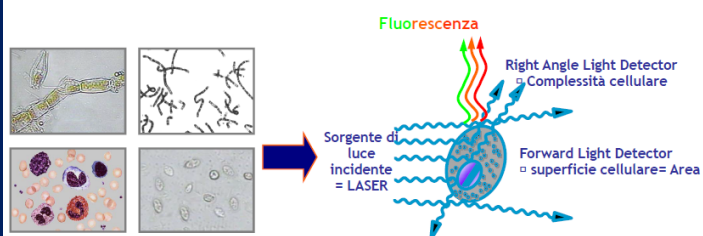
coefficiente di variazione
cioè la deviazione standard diviso
la media il tutto per 100





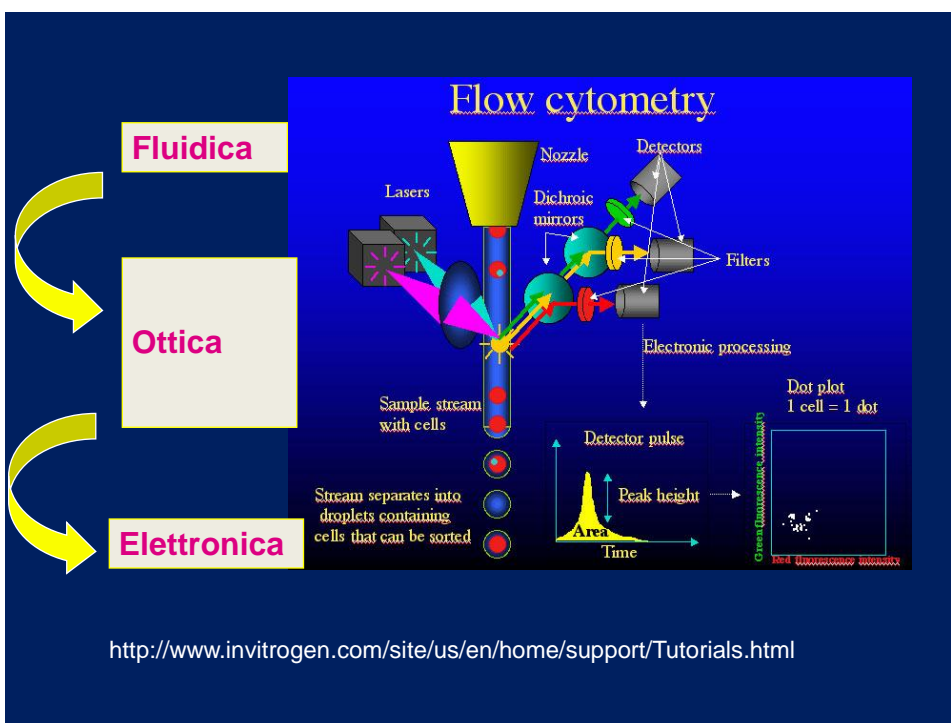
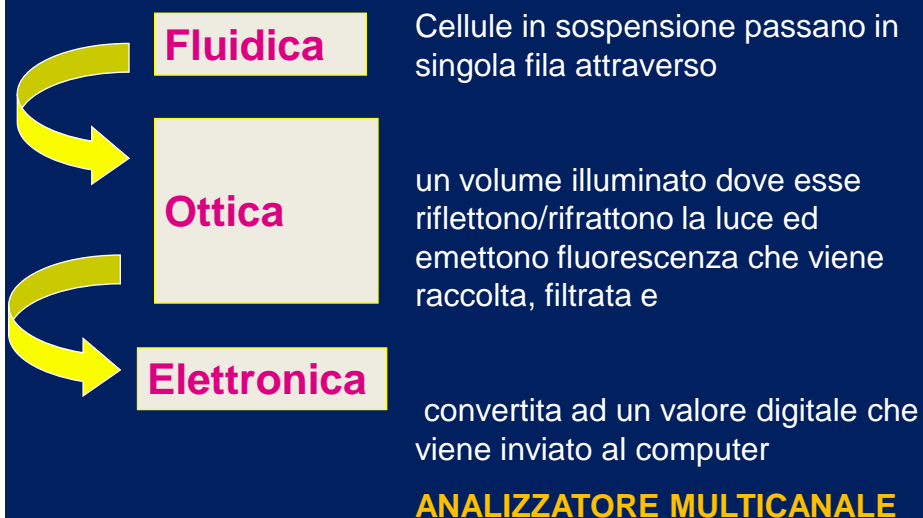
Passiamo ora alla tecnica....

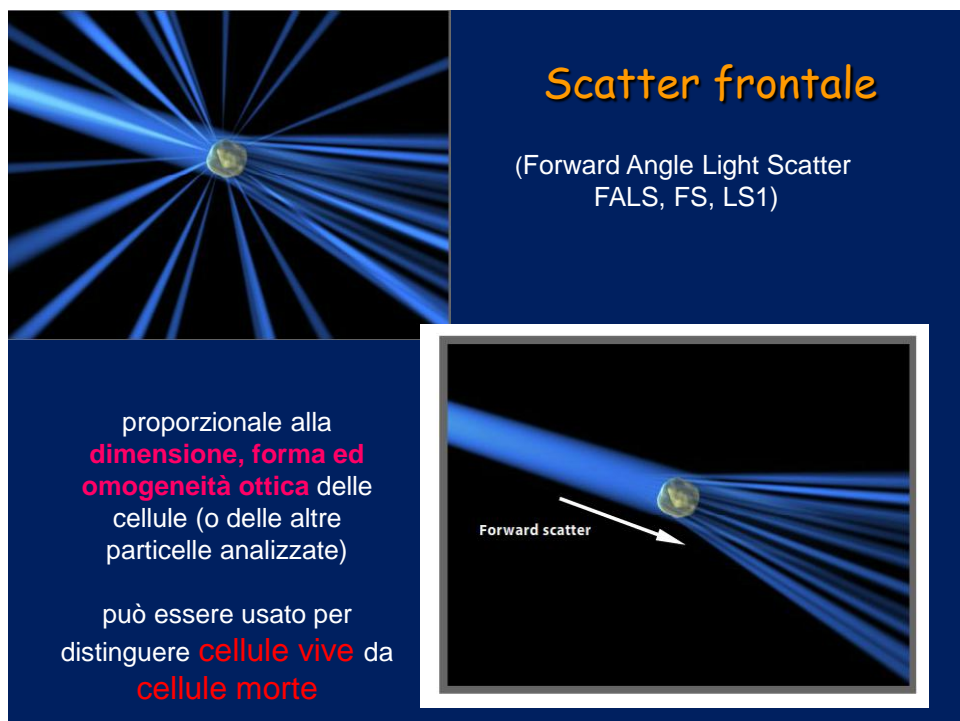
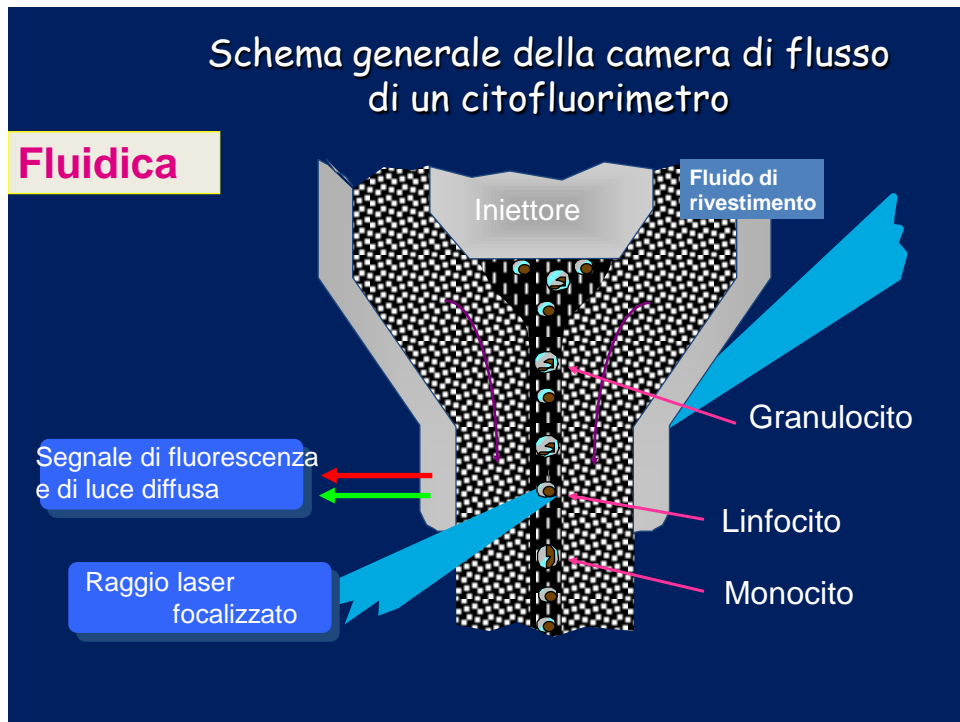
Il citofluorimetro consente di valutare:



- Dimensioni relative (FSC)
- Complessità interna / Granularità relativa (SSC)
- Intensità di fluorescenza relativa (FL1, FL2, FL3 ...)

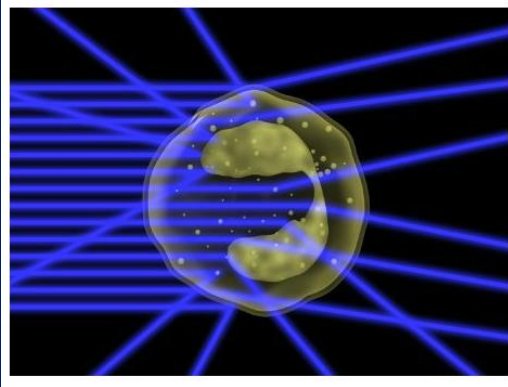
Basi della Citometria a Flusso





Scatter laterale

(90 Degree Light Scatter SS, LS2)

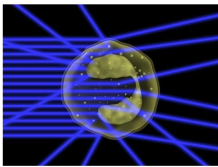
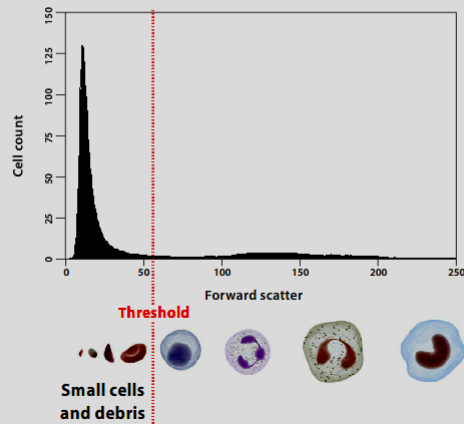


È piu' legato alla
complessita' interna
delle cellule

può essere usato per distinguere
cellule granulate da cellule non-
granulate

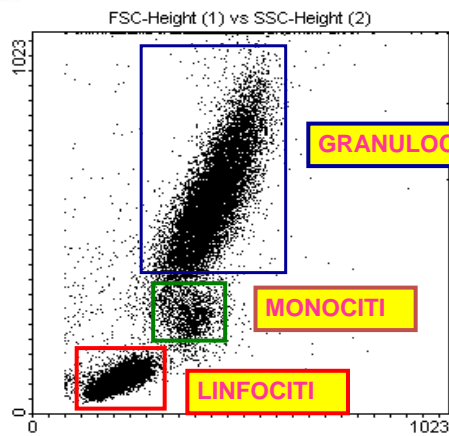
I segnali di scattering e di fluorescenza (che riguardano CIASCUNA CELLULA DEL CAMPIONE ESAMINATO) , sono analizzati e rappresentati dal computer come **istogrammi** di ciascun parametro esaminato o come rappresentazioni bi o tridimensionali, combinando piu' parametri tra di loro.

Forward Scatter Threshold

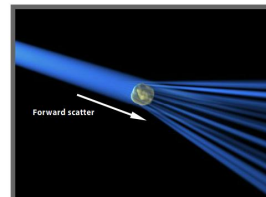


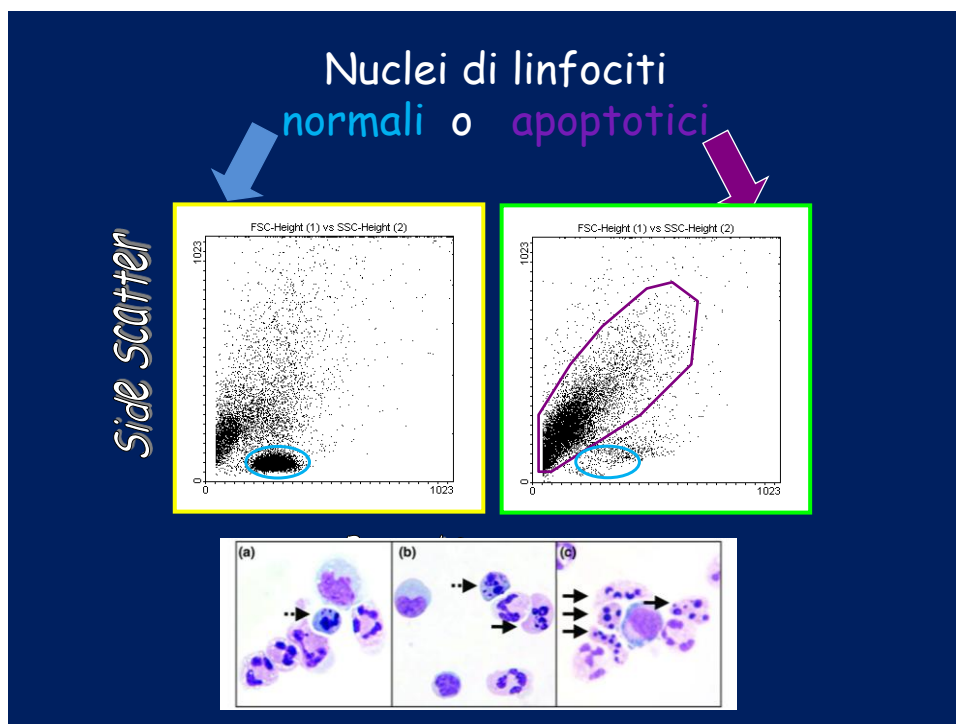
Esempio di analisi dei leucociti

Side Scatter



Forward Scatter





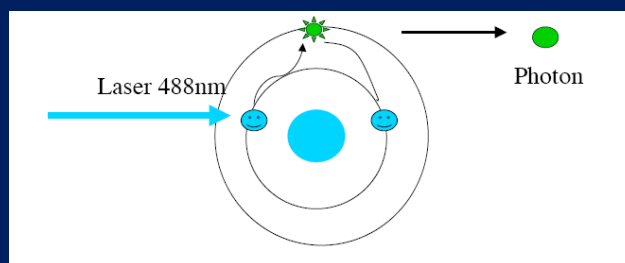
Segnali di fluorescenza

Sono dovuti :

- 1) a molecole fluorescenti presenti nelle cellule
(**fluorescenza intrinseca**)
- 2) a molecole fluorescenti capaci di rilevare parametri biochimici o strutturali di interesse e che vengono "date" alle cellule dall'esterno (**probes fluorescenti**)

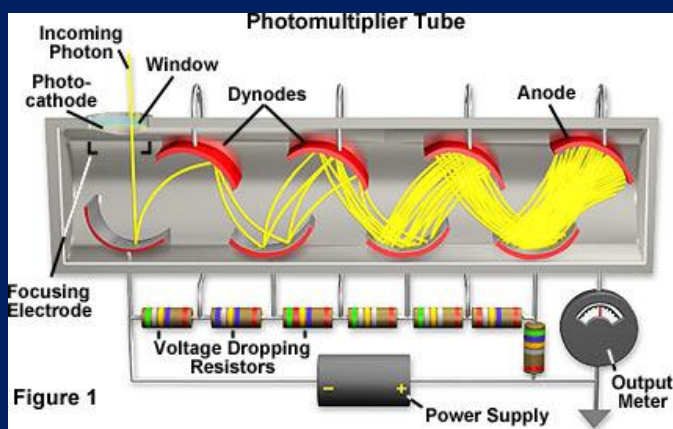
Come lavorano i fluorocromi?

- Un laser eccita il fluorocromo
- il fluorocromo eccitato sale nel livello successivo della nuvola elettronica
- il fluorocromo ritorna al livello originale e rilascia l'energia in eccesso come fotone
- i fotoni emettono a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quelle a cui vengono eccitati (Stokes's shift)



fluorescein: assorbe blu chiaro ed emette verde

La fluorescenza viene misurata in UNITA' ARBITRARIE, in quanto e' possibile variare la sensibilita' dei fotomoltiplicatori

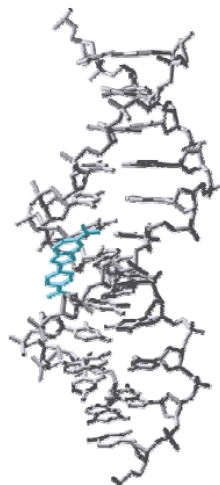
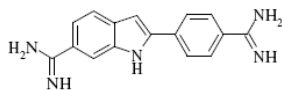
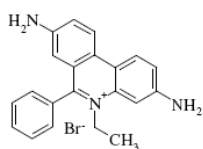


- Le misure possono essere sia **qualitative** che **quantitative**: queste ultime specialmente se si possono allestire degli opportuni standard.
- In microscopia si utilizza sia per misure qualitative, per evidenziare la presenza di determinate caratteristiche o di determinate strutture cellulari che quantitative se accoppiamo al microscopio un sistema di rivelazione di fluorescenza (citofluorimetria statica)

- Spesso in citometria si fanno misure **SEMIQUANTITATIVE** di confronto (determinare ad esempio se una cellula ha più DNA di un'altra e quanto di più, se il doppio, il triplo o il 2% in più)
- Per determinazioni assolute (quanti picogrammi di DNA per cellula) dobbiamo quasi sempre rifarci a standard di riferimento.

Sonde per Acidi Nucleici

- Intercalanti
 - Etidio bromuro (propidio ioduro)
 - DAPI



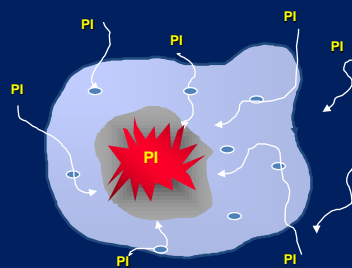
PI - Vitalità cellulare

Come funziona:

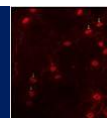
- PI non può normalmente attraversare la membrana cellulare
- Se PI penetra la membrana cellulare, vuole dire che è danneggiata
- Cellule che sono fluorescenti con PI sono sofferenti o morte



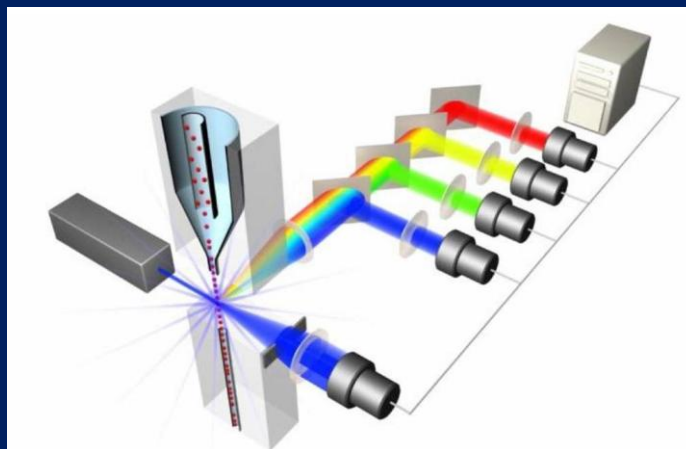
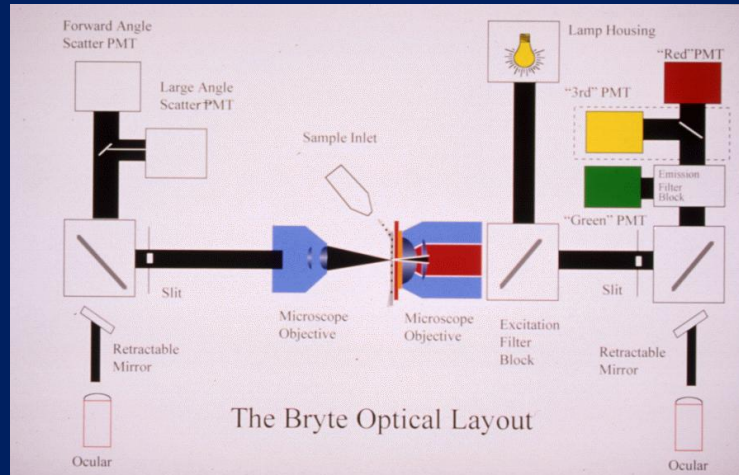
Cellula vitale



Cellula danneggiata

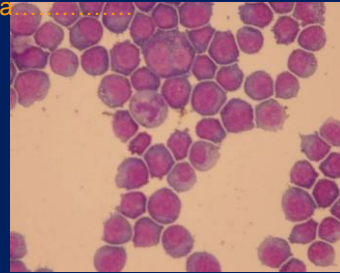
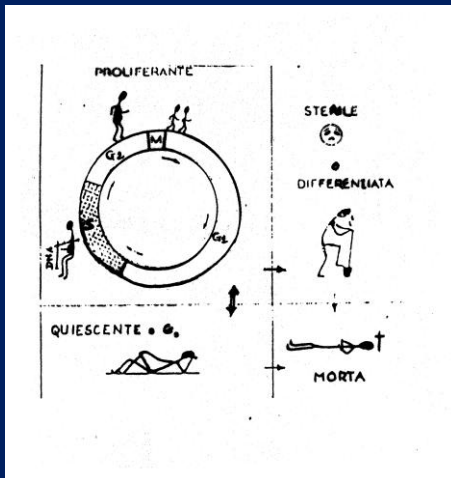


Tutte queste marcature possono essere “lette” da un citofluorimetro

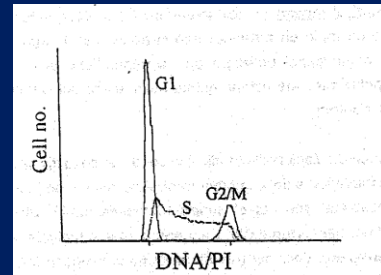


Analisi del ciclo cellulare e/o della ploidia

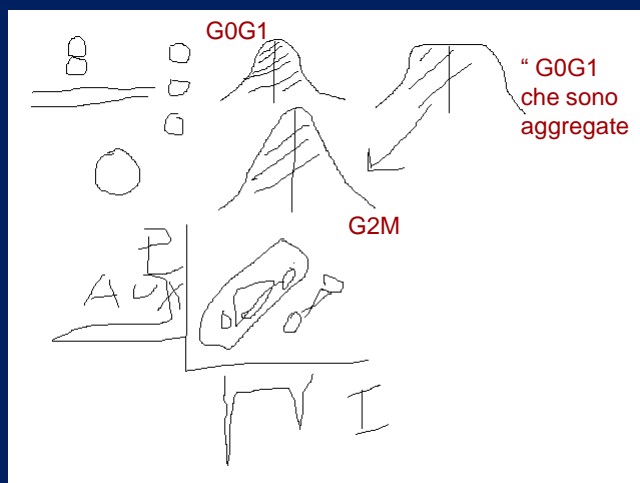
La marcatura deve essere stechiometrica



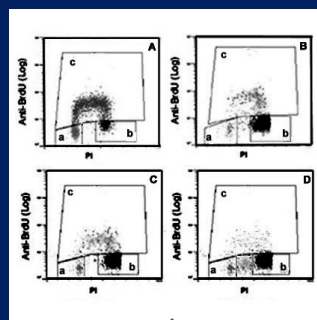
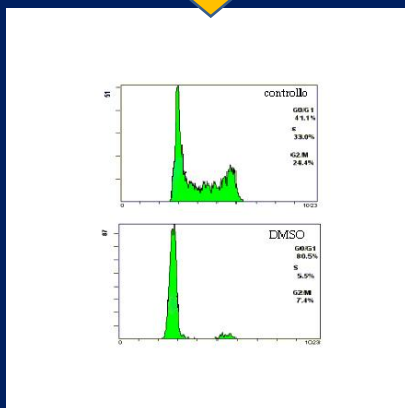
Analisi monoparametrica
Sonde PI, DAPI, HOECHST ecc



Discriminare i doppietti

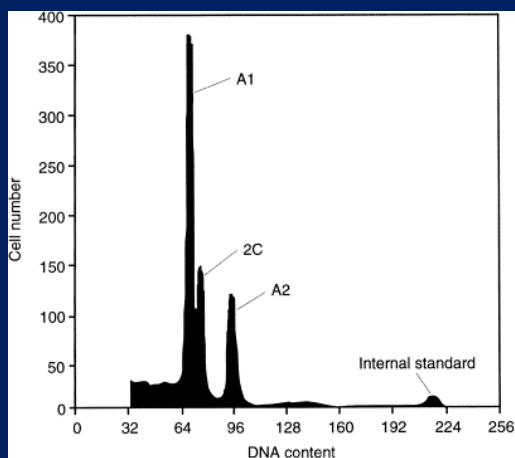


Confronto del ciclo cellulare in cellule proliferanti e differenziate (bloccate in G0/G1)



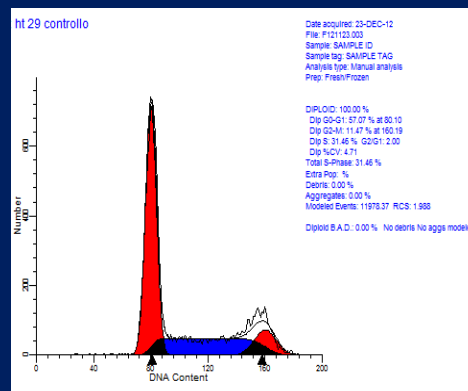
Analisi biparametrica del ciclo cellulare
Marcatura di tutto il DNA con PI e della fase S con BrdU rivelata con un anticorpo fluoresceinato

Ciclo cellulare di cellule aneuploidi (A1 e A2) rispetto alle cellule normali (C2)
N.B: Per la valutazione corretta si usa uno standard interno

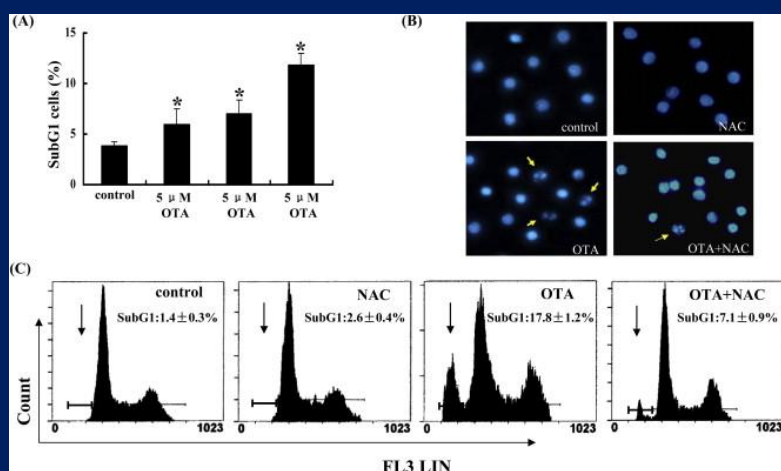


Analisi dei dati analizzati

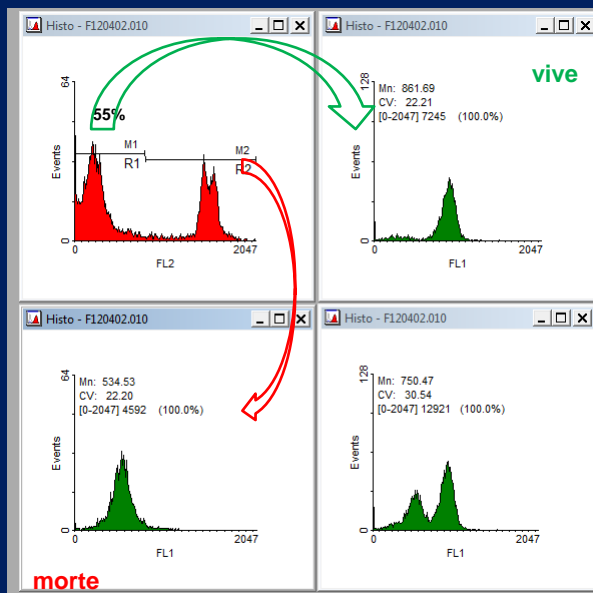
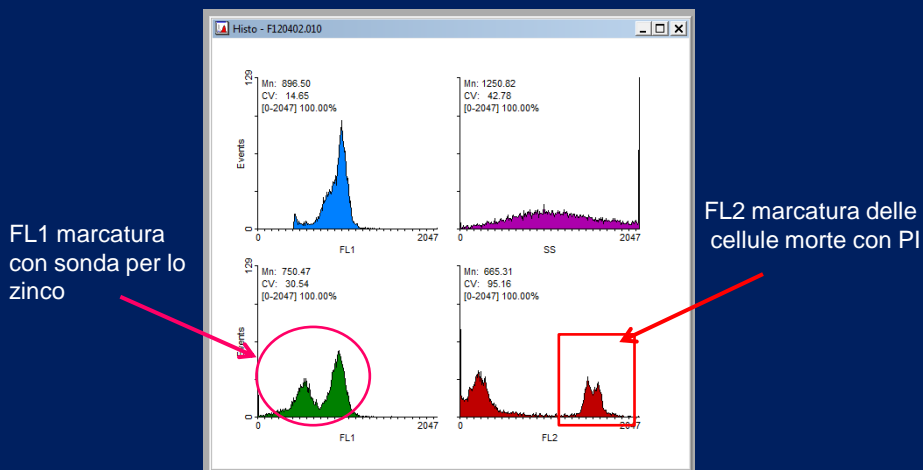
- I campioni vengono analizzati per ottenere dei “dati” numerici, come ad es. la percentuale di cellule che possiede quella certa intensità’ di un parametro



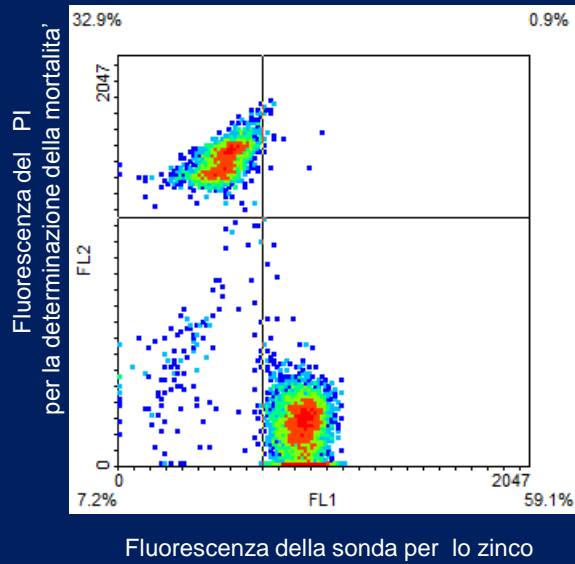
Apoptosi : determinazione del picco sub G1 ovvero delle cellule che hanno perso una parte del DNA



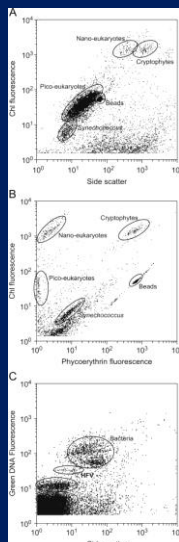
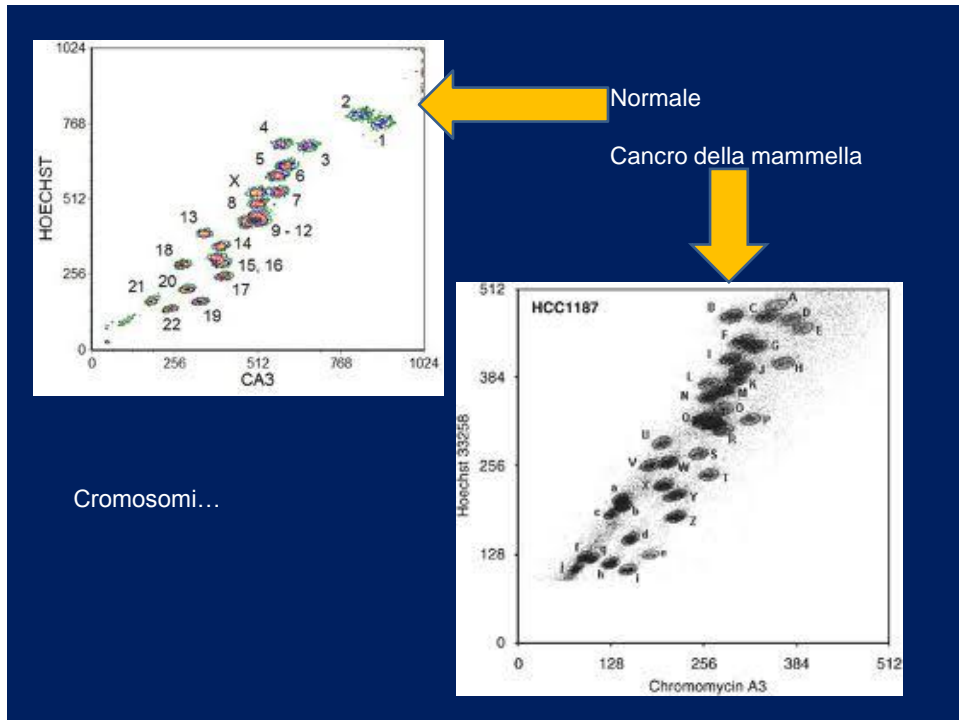
La funzione di “GATING”



La stessa analisi.....in un altro formato



Non solo cellule....



Continental Shelf Research

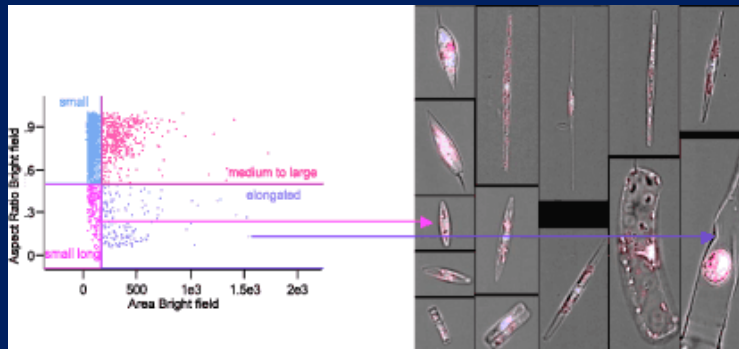
Volume 31, Issue 14, 15 September 2011, Pages 1500–1514

Research papers

The plankton community in Norwegian coastal waters—abundance, composition, spatial distribution and diel variation

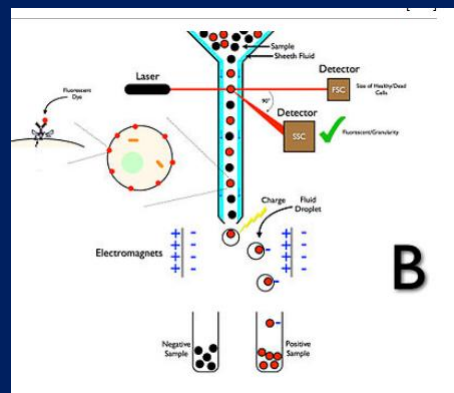
Gunnar Bratbak^{a, *}, Stéphan Jacquet^b, Aud Larsen^c, Lasse H. Pettersson^d, Andrey F. Sazhin^e, Runar Thyrrhaug^{a, 1}

Analisi delle acque: valutazione del plancton



Amnis Image stream application

E infine il sorting....



Grazie per l'attenzione!

